

**EINE MODIFIKATION DER
SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE**

Reinhold Muschong

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des
Deutschen Herzzentrums München
Direktor: Prof. Dr. med. F. Sebening

EINE MODIFIKATION DER
SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhold Muschong

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Sebening

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Kliner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1976



Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A: EINLEITUNG	1
B: ELEKTROPHORESEVERFAHREN MIT MOLEKULAR- SIEBEFFEKT	3
1) Natürliche Gele	3
a) Agargel	3
b) Stärkegel	3
2) Synthetisches Gel	3
a) Polyacrylamid	3
aa) Kontinuierlich-Diskontinuierlich	4
ab) Gradient	5
3) Änderung der Eigenschaften der Proteine durch SDS	6
C: MATERIAL UND METHODIK	9
1) Versuchsaufbau	9
2) Für die Elektrophorese benötigte Substanzen	11
3) Gelherstellung	14
4) Puffersystem	15
a) ohne SDS	15
b) mit SDS	15
5) Probenvorbehandlung und -auftrag	16
a) ohne SDS	16
b) mit SDS	16
6) Trenntechnik	17
7) Fixierung, Färbung und Entfärbung	17
8) Auswertung	19
9) Untersuchungsmaterial	20

	<u>Seite</u>
D: ERGEBNISSE	21
I) Untersuchung der Trenneigenschaften	21
1) Ermittlung der optimalen SDS- -Probenabsättigung bei SDS-freiem Gel	21
2) Prüfung der Trenneigenschaften mit Eichsubstanzen definierter Moleku- largewichte	22
a) mit der Zelluloseacetatfolien- elektrophorese	22
aa) Substanzen unbehandelt	22
ab) Substanzen SDS-behandelt	23
b) mit der Polyacrylamidelektro- phorese	23
c) mit der Polyacrylamidelektro- phorese und Behandlung mit SDS	24
d) SDS-Kontrollversuch	25
3) Auftrennung eines Gemisches	31
4) Allgemeines (Altern der Seren, Re- produzierbarkeit, quantitative Auswer- tung)	31
II) Untersuchungen an Normalseren	33
1) ohne SDS	33
2) mit SDS	34

	<u>Seite</u>
III.) Untersuchungen an Plasmocytomseren	34
1) ohne SDS	35
2) mit SDS	35
E: DISKUSSION	36
1) Zur eigenen Modifikation der Methodik	36
2) Bestimmung des Molekulargewichtes	37
3) Vergleichende Serumuntersuchungen	39
F: ZUSAMMENFASSUNG	41
G: LITERATURVERZEICHNIS	42

A: EINLEITUNG

Die Elektrophorese in einem elektrischen Gleichspannungsfeld ermöglicht die Charakterisierung von Einzelkomponenten eines Eiweißgemisches nach ihrer Nettoladung. Dabei erfolgt die Auftrennung des Proteingemisches gemäß der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit seiner Bestandteile in Abhängigkeit von Ladung und Größe der Moleküle. Die Klassifizierung der so nachweisbaren Globulinfraktionen in α , β und γ spiegelt nicht die Auftrennung in chemisch oder physiologisch einheitliche Körper wider, sondern entspricht lediglich ihrem Verhalten im elektrischen Feld.

Eine elektrophoretische Trennung kann entweder im Trennrohr, als sogenannte freie Elektrophorese (TISELIUS), oder mittels Stabilisierung des Elektrolyten in festen Medien (Träger) vorgenommen werden ; als Träger kommen Papier, Zelluloseacetatfolien, Agar und Stärke zur Anwendung.

Die Einführung der Papierelektrophorese und die damit gegebene Möglichkeit der Serumauftrennung in Präalbumin, Albumin, α , β und γ -Globulin stellte eine Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten dar, und die zudem relativ einfache Handhabung hat sie zu einer klinischen Routinemethode werden lassen.

Zeigte bereits die Agargel-Elektrophorese eine bessere Auftrennung als die Papierelektrophorese, so eröffneten erst recht die Stärkegel- und Polyacrylamidgelelektrophorese neue Möglichkeiten.

Das synthetische Polyacrylamidgel wurde erstmals von RAYMOND und WEINTRAUB (30) dazu benützt, um Hämoglobin zu trennen.

ORNSTEIN und DAVIS (2, 24) waren es dann, die im Zuge der Weiterentwicklung des Verfahrens die Disk (= diskontinuierliche)-Polyacrylamidelektrophorese einführten.

Polyacrylamidgel zeigt eine bessere Auftrennung von Proteingemischen als es mit Papier, Zelluloseacetat und Agarose gelingt. Dies beruht zum großen Teil darauf, daß aufgrund der engmaschigen Gitterstruktur des synthetischen Gels die Wanderung im elektrischen Feld nicht nur von der Ladung, sondern auch von der Größe und Form des Moleküls abhängig ist ("Siebeffekt").

Während man mit der Papier- und Zelluloseacetatfolien-elektrophorese die Auftrennung der Serumproteine in Proteingruppen erreicht, lassen sich Humanserum in der Polyacrylamidelektrophorese in 15-20 Einzelbanden trennen.

Die Polyacrylamidelektrophorese trennt Proteingemische gemäß Ladung und Molekülgröße: SHAPIRO (11, 34) gelang 1967 durch Einführung von SDS (sodium dodecyl sulfate) und der damit verbundenen Abblockung der Ladungen die Auftrennung von Proteinen allein nach ihren Molekulargewichten.

So fand dann die SDS-Methode auch in erster Linie Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung verschiedener Proteine. FOLK (4) allerdings wandte die SDS-Methode auch zur Auftrennung von Humanserum an, und kam dabei zu dem Schluss, daß diese Art der Serumauswertung sich zum Studium von pathologisch veränderten Seren als nützlich erweisen könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt Untersuchungen, die zu einer eigenen Modifikation der SDS-Polyacrylamidelektrophorese führten, und berichtet über die Ergebnisse der an Normal- und Plasmocytomserum vergleichend mit und

ohne SDS durchgeführten Polyacrylamidelektrophoresen.

B: ELEKTROPHORESEVERFAHREN MIT MOLEKULARSIEBEFFEKT

1) Natürliche Gele

a) Agargel

Die Agargel-Elektrophorese weist nur einen geringen Siebeffekt auf, und liefert ein ähnliches Pherogramm, wie es die Papierelektrophorese zeigt.

Von Vorteil ist die relativ kurze Elektrophoresedauer und die für die Auswertung wichtige völlige Transparenz der Schichten, nachteilig wirkt sich allerdings die starke Elektrosmose aus.

b) Stärkegel

Wenn man von einem geringen Siebeffekt bei der Agargel-Elektrophorese absieht, wurde mit dem Stärkegel erstmals ein Trägermedium verwendet, das Proteine während des Elektrophoreseablaufes auch nach Molekülgröße bzw. Achsenverhältnis zu sieben vermag.

Was die Auftrennung betrifft, so erzielt man mit Stärkegel ähnlich gute Ergebnisse wie mit Polyacrylamidgel (36).

Aber wie beim Agargel können trotz guten Auswaschens Verunreinigungen vorhanden sein, so daß die Reproduzierbarkeit leidet.

2) Synthetisches Gel

a) Polyacrylamid

Polyacrylamid ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und N,N'-Methylenbisacrylsäureamid.

Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels hängen teils vom Polymerisationsgrad (Kettenlänge) des Polyacrylamids, teils vom Vernetzungsgrad ab, d.h. von der Menge des eingebauten Vernetzers N,N'-Methylen-bisacrylamid (23).

Polymerisations- und Vernetzungsgrad bestimmen die Dichte des Gelgitterwerkes, die sich als durchschnittliche Porengröße ausdrücken läßt. Die Porengröße spielt für die Trennung von Molekülen nach dem Molekularsiebeffekt eine entscheidende Rolle.

Das Polyacrylamidgel zeigt eine so dichte Innenstruktur, daß seine Porengrößen im Bereich des molekularen Proteindurchmessers liegen. Dadurch werden die Moleküle bei ihrer Wanderung je nach ihrer Größe in unterschiedlichem Ausmaß gebremst.

Polyacrylamidgel weist gegenüber Trägern wie Papier, Zelluloseacetatfolie und Stärkegel entscheidende Vorteile auf:

- Die Porengröße von Polyacrylamidgelen ist durch die Wahl geeigneter Konzentrationen von Monomer und Komonomer (Vernetzer) reproduzierbar einzustellen (23).
- Das Gel ist völlig transparent und selbst für kurzwelliges UV-Licht durchlässig; nach Färbung läßt es sich direkt densitometrisch auswerten.
- Adsorption und Elektroosmose spielen für die Trennung keine Rolle (18, 28, 29).

aa) Kont. - Disk.

Die kontinuierliche Polyacrylamidelektrophorese (30) ver-

wendet homogene Puffersysteme einheitlicher pH-Werte.

Von der kontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese unterscheidet sich die Disk-Elektrophorese (8, 24) durch die Einführung von pH- und Porengrößen-Diskontinuitäten innerhalb der Gelsäule. Diese Diskontinuitäten erzeugen einen Konzentrierungseffekt in Anwendung der Kontinuitätsfunktion nach KOHLRAUSCH (20): Danach werden die Substanzen vor ihrer Trennung zu einer scharf begrenzten Zone konzentriert. Das Trennvermögen dieser Methode beruht daher auf der Kombination von Molekularsieb- und Konzentrierungseffekt.

Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem in der sehr geringen Auftragsmenge, der Konzentrierung verdünnter Stofflösungen und dem hohen Auflösungsvermögen.

Die auf dem Gebiet der Polyacrylamidelektrophorese durchgeführten Arbeiten basieren in der Mehrzahl auf der Disk-Methode, wobei aber die grundsätzliche Frage, ob diskontinuierliche Puffersysteme Vorteile gegenüber kontinuierlichen bieten, nicht einheitlich beantwortet wird. RAYMOND (28) lehnt diskontinuierliche Systeme ab, weil man nach seiner Ansicht auch in kontinuierlichen scharfe Startzonen erhält. HJERTEN (15), ABRAHAM (1) und SCHÜTT (32) wiesen darauf hin, daß mit der von ihnen verwendeten, technisch einfacheren kontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese bei ausreichender Konzentration der Startzone eine gleichwertige Trennung von Seren im Vergleich zur diskontinuierlichen Form gewährleistet ist.

bb) Gradient

Nach SEATON (35) lassen sich gewisse Plasma- und Zellproteine in Polyacrylamid-Porengradienten besser auflösen.

Die Methode verdient Beachtung, da sie der Polyacrylamidgelelektrophorese mehrere Variationsmöglichkeiten erschließt (23):

Man kann unterschiedliche Acrylamid- und/oder N,N'-Methylenbisacrylamid-Konzentrationsgradienten einstellen; ferner kann man Form (linear, gestuft, exponentiell usw.) und Neigung der Gradienten verändern.

Einen Apparat, der reproduzierbare Gel-Gradienten liefert, entwarfen MARGOLIS und KENRICK (22).

3) Änderung der Eigenschaften der Proteine durch SDS

Natriumdodecylsulfat ($C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$) ist ein oberflächenaktives Netzmittel. Es bildet mit Proteinen einen Komplex; die Bindung an das Protein ist hydrophob (31) und sehr labil.

Das Gleichgewicht wird dadurch gestört, daß SDS teilweise aus der Probe heraus elektrophoriert wird; um das Gleichgewicht aufrechtzuerhalten, ist ein Pufferreservoir nötig, aus welchem SDS nachströmen kann.

Wenn SDS mit einem Protein reagiert, geht der ampholytische Ladungscharakter des nativen Proteins verloren, und es bildet sich ein SDS-Protein-Komplex, der nach außen lediglich eine negative Nettoladung trägt.

Untervirft man solche abgesättigte SDS-Protein-Komplexe der Polyacrylamidgelelektrophorese, so kommt es zur Trennung der Proteine gemäß ihrer Molekulargewichte, und da die elektrische Ladung dabei eine Rolle spielt. Die bei der Trennung von den Proteinen jeweils zurückgelegte Strecke korreliert sehr gut mit der Molekülgröße der Proteine.

SHAPIRO (34) hat diese Beziehung zwischen relativer Beweglichkeit (die von einem Protein während der Elektrophorese zurückgelegte Strecke wird als 100 festgesetzt und die Wanderstrecken der übrigen Substanzen werden in % davon ausgedrückt - Rf-Wert) und Molekulargewicht in folgende Formel gefaßt:

$$\text{Molekulargewicht} = K \cdot (10^{-bx})$$

wobei K = Materialkonstante des Gelsystems

x = Wanderungsstrecke

b = Steigung der Eichgeraden

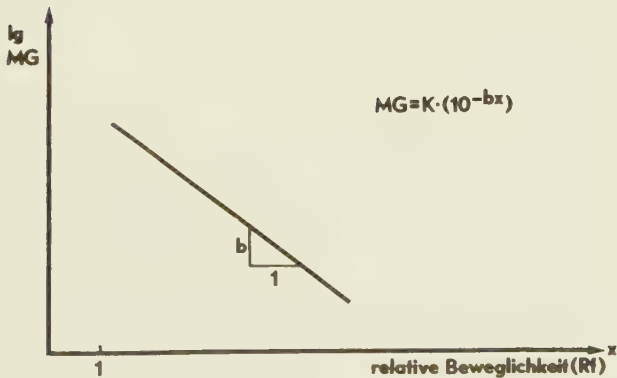


Abb. 1 Darstellung der Abhängigkeit zwischen relativer Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes

Nahezu alle Autoren (4, 11, 31, 33, 34, 39) verwendeten bei ihren Untersuchungen der SDS-Polyacrylamidelektrophorese das Netzmittel auch als Bestandteil des Gels. Dagegen führte BLATTNER (3) neben Versuchen mit der herkömmlichen SDS-Methode auch solche mit SDS-freien Gelen durch.

Die Anwendbarkeit der kontinuierlichen Form der Polyacrylamidelektrophorese auf das Arbeiten mit SDS zeigt HEIDRICH (14) in seinen Untersuchungen.

C: MATERIAL UND METHODIK

1) Versuchsaufbau (Abb.2)

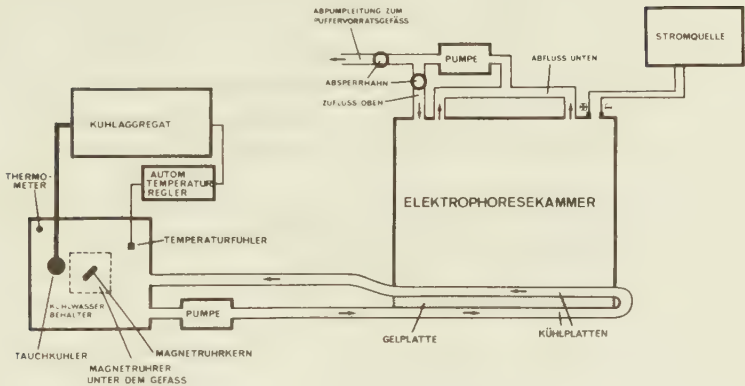


Abb. 2 Versuchsanordnung (Draufsicht)

Im Mittelpunkt des Systems steht die vertikale Elektrophoresekammer¹⁾ nach RAYMOND (27, 28), die sich durch folgende Besonderheiten auszeichnet

- es wird mit plattenförmigen Gelen gearbeitet, die bei der densitometrischen Auswertung keine sphärische Aberration zeigen
- unter völlig identischen Bedingungen lassen sich bis zu 24 Proben in einem Gel vergleichend untersuchen

¹⁾ Typ EC-490

EC-APPARATUS CORPORATION, St. Petersburg, U.S.A.

- das Gel liegt zwischen zwei von Flüssigkeit durchströmten Kühlplatten, was ein Minimum an Temperaturschwankungen innerhalb des Gels gewährleistet
- die Gelplattenstärke ist variabel (3mm und 6mm)
- zur Aufnahme des Untersuchungsmaterials dienen Probenaschen, die durch einen Probenstempel im Gel erzeugt werden. Dadurch wird verhindert, daß die Substanzlösung zwischen Gußform (Kühlplatten) und Gel entlang fließt (Kanaleffekt) und es so zur Bandverzerrung und "Schwanzbildung" kommt
- durch Umwälzung des Elektrodenpuffers mit einer Pumpe durch ein Überlaufrohr zwischen den beiden Kammern werden pH-Schwankungen sehr klein gehalten
- die Trennstrecke beträgt bis zu 16 cm Länge

Als Pumpen werden Kreiselumpen²⁾ mit magnetisch gekoppeltem Läufer benutzt, die sehr laufruhig und wartungsfreundlich sind.

Der Elektrodenpuffer wird aus zwei gegenüberliegenden Öffnungen in der unteren Kammer abgepumpt, was eine noch bessere Durchmischung des Puffers bewirkt.

Das zum Durchströmen der Kühlplatten benötigte Wasser (Aqua dest.) wird in einem Bottich durch einen Tauchkühler³⁾ gekühlt. Temperaturkonstanz wird durch einen Regler mit Messfühler im Vorratsgefäß gewährleistet. Um ein gleichmäßiges Durchmischen des Kühlwassers zu er-

2) Fa. EHEIM, 7301 Deizisau

3) Fa. COLORA, Lorch/Württ.

reichen, wird es zusätzlich mittels Magnetprüher in Bewegung gehalten. Eine bereits erwähnte Kreiselpumpe sorgt für den Durchfluß durch die Kühlwindungen.

Die verwendete Stromquelle⁴⁾ erlaubt bei automatisch erfolgender Spannungsnachführung ein Arbeiten mit konstanter Stromstärke.

2) Für die Elektrophorese benötigte Substanzen

Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C (Kühlschrank).

Tris= Trishydroxymethylaminomethan⁵⁾ p.A.
 Festsubstanz Gehalt mind. 99,8%
 10% Lösung pH 10,65
 Mol. Gew. 121,1

Borsäure⁵⁾ p.A.
 Festsubstanz Mol. Gew. 61,83
 Schwermetallfrei für Pufferzwecke

Acrylamid⁵⁾ reinst 2x rekrist.
 Festsubstanz Fp 84-86°
 Mol. Gew. 71,1
 Spezialpräparat für die Disk-Elektrophorese

Bis=N,N'-Methylenbisacrylamid⁵⁾ reinst 2x krist.
 Festsubstanz Mol. Gew. 154,2
 Spezialqualität für die Gelelektrophorese

TEMED =N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin⁵⁾ reinst 99 %
 Kp = 118-124° d = 0,77

⁴⁾ Fa. SHANDON, London, England

⁵⁾ Fa. SERVA, Heidelberg

Geprüft als Katalysator für Acrylamid-
-Polymerisation
Mol. Gew. 116,2

Ammoniumpersulfat⁵⁾ p.A.

Schwermetalle (Pb) 0,0025%

Chlorid (Cl) 0,0005 %

Festschubstanz Mol. Gew. 288,2

Katalysator für Acrylamid-Polymerisation

SDS=Dodecylsulfat • Na-salz⁵⁾ krist. reinst

>99% aktive Substanz

C₁₀- und C₁₄-sulfate ~1%; Asche ~1%

Festschubstanz Mol. Gew. 288,4

Bromphenolblau Na-salz⁵⁾ reinst

Wasserlöslich

Indikator pH 3,0-4,6 Farbumschlag gelb-blau

Festschubstanz Mol. Gew. 692,0

Glycerin⁵⁾ p.A. 99,5%

Doppelt destilliert d = 1,26 (Glycerol)

Coomassie Brilliant Blue R-250⁵⁾ rein

Festschubstanz

Für Proteinfärbung nach Gelelektrophorese

Trichloressigsäure⁶⁾ krist. DAB 7

Festschubstanz Mol. Gew. 163,39

6) Fa. MERCK, Darmstadt

Als Stammlösungen wurden verwendet

Gel	Tris	10,90 %
	Borsäure	3,60 %
	Arcylamid	20,00 %
	Bis	0,67 %
	Ammoniumpersulfat *	0,25 %
Puffer	Tris	1,37 %
	Borsäure	0,46 %
	Tris	1,37 %
	Borsäure	0,46 %
	SDS	0,10 %
Probe	Bromphenolblau	1,00 %
Fixierung	Trichloressigsäure	12,50 %
Färbung	Coomassie Brilliant Blue	1,00 %
	Trichloressigsäure	12,50 %
Entfärbung	Trichloressigsäure	12,50 %

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

Sämtliche Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

* Diese Lösung wird erst unmittelbar vor Gebrauch eingesetzt.

3) Gelherstellung

Polyacrylamidgel ist Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylsäureamid.

Das dreidimensionale Maschenwerk des Gels bildet sich durch Vernetzung nebeneinander wachsender Polyacrylamid-Ketten, die nach Art der Vinyl-Polymerisation (Ko- und Mischpolymerisation in Lösung) entstehen.

Dabei entwickeln sich zunächst zahlreiche, statistische Polymer-Gelknäuel, in denen die Polyacrylamid-Ketten den Zustand maximal möglicher Entropie, d.h. die unregelmäßigste Gestalt einnehmen. Die wachsenden Knäuel rücken zusammen und vernetzen dort miteinander durch Hauptvalenzen, wo mehrfunktionelle Verbindungen, wie N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer in Polymerketten eingebaut sind und mit freien, funktionellen Gruppen am Ende anderer Ketten reagieren können (23).

Sämtliche Versuche wurden mit Gelen durchgeführt, die 5 Acrylamid enthielten.

40 ml Lösung I	54,5 g Tris
	+ 18,0 g Borsäure/500 ml

80 ml Lösung II	100,00 g Acrylamid
	+ 3,34 g Bis /500 ml

160 ml H₂O

0,1 ml TEMED

werden in eine Rührflasche gegeben, diese wird an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und mit einem Gummipfropfen verschlossen. Man entgast etwa 5 Min., um den die Polymerisation hemmenden molekularen Sauerstoff möglichst weitgehend zu entfernen; reproduzierbare Gele er-

hält man nur, wenn die Polymerisation nicht verzögert wird.

Anschließend wird die frisch bereitete Lösung aus

0,1 g Ammoniumpersulfat
+ 40 ml H_2O

hinzugegeben und die Lösung sofort unter Vermeidung von Blaserbildung bei leicht schräg gestellter Kammer zwischen die Kühlplatten eingegossen.

Zur Stabilisierung des Gels wird am Boden der Kammer ein Schwammstreifen zwischen die Kühlplatten eingelegt, da sonst bei einer Acrylamidkonzentration von nur 5 % das Gel nach unten abrutschen kann.

Die Gelierung tritt etwa 15-20 Min. später ein.

Nachdem das Gel fest ist, wird es fortlaufend gekühlt(6).

Die Kühlwassertemperatur beträgt $3,5^{\circ}C$, wobei aber die eigentliche Geltemperatur nach Messungen im ableitenden Teil des Kühlsystems etwa $2-4^{\circ}C$ höher liegt.

4) Puffersystem

a) ohne SDS

68,7 g Tris
+ 22,7 g Borsäure/5000 ml pH 8,65

b) mit SDS

68,7 g Tris
+ 22,7 g Borsäure
+ 5,0 g SDS /5000 ml pH 8,70

Als Elektrodenpuffer (14) wird ein Tris/Borsäure-Puffer verwendet.

Der Elektrodenpuffer kann bis zu 5mal benützt werden, allerdings ist vor der Wiederverwendung stets eine Messung des pH-Wertes und ein eventueller Abgleich mit Tris bzw. Borsäure nötig. Der Puffer muß umso eher verworfen werden, je mehr Proben pro Lauf getrennt werden.

5) Probenvorbehandlung und -auftrag

a) ohne SDS

Nativserum ohne Vorbehandlung kann verwendet werden, bei Vergleichsuntersuchungen mit SDS-haltigen Proben wurden jedoch die Proben für 30 Min. bei 30°C gehalten, um absolut gleiche Vorbedingungen zu schaffen.

Ist einmal eine Probe sehr verdünnt, so werden pro 100 µl Probe ca. 10 µl Glycerin zugegeben, um die Dichte der Probe zu erhöhen und ein Aufschwemmen im Puffer zu verhindern ($1 \mu\text{l} = 10^{-6} \text{ l}$).

b) mit SDS

Die Proben werden für den SDS-Versuch wie folgt behandelt:

100 µl Serum + 10 mg SDS (Trockensubstanz) werden für 30 Min. bei 30°C inkubiert.

Empirisch wurde ermittelt, daß für Probentaschen von den Abmessungen 1,7 x 5,8 mm eine Auftragsmenge von 5 µl je Tasche die beste Trennschärfe ertringt (bei Gelplatte 3mm). Vor dem Probenauftrag ist die Puffersirkulation auf ein Minimum zu reduzieren, um ein Aufschwemmen der Proben zu vermeiden.

Das Einbringen der Proben in die Taschen erfolgt im Streiflicht einer Taschenlampe (zur besseren Sichtbarkeit der Taschengeometrie) mit einer Mikroliterspritze⁷⁾ und stumpfer Nadel.

Zu einer der Proben wird zur Albuminmarkierung Bromphenolblau zuzesetzt (100 µl Serum + 10 µl einer 1% Bromphenolblaulösung), um später bei Erreichen der vorgesehenen

⁷⁾ TERUMO (Japanisches Produkt), zu beziehen über Fa. SHANDON, Frankfurt/M.

Wanderstrecke die Elektrophorese abbrechen zu können.

6) Trenntechnik

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wird bei der Trennung das Arbeiten mit konstanter Stromstärke bevorzugt, auch ergibt sich so eine direkte Abhängigkeit zwischen Elektrophoresedauer und zurückgelegter Trennstrecke. Ein Vorlauf (Prerun) für 30 Min. mit einer Stromstärke von 65 mA (27) geht der Elektrophorese voraus.

Damit die aufgebrauchten Proben sich absetzen können, wartet man nach dem Auftrag noch 5 Min., dann stellt man eine Stromstärke von 30 mA ein, und erhöht diese nach 15 Min. auf 65 mA.

Mit der Erhöhung der Stromstärke wird auch die Pufferzirkulation verstärkt.

Die Trennstrecke war durch das verwendete Auswertegerät auf etwa 10 cm (Albuminbande) beschränkt, die dafür erforderliche Elektrophoresedauer liegt bei etwa 1 1/2 - 2 Stunden, wobei die Trennung im SDS-Versuch ein wenig schneller abläuft.

7) Fixierung, Färbung und Entfärbung

Nach durchgeführter Elektrophorese gibt man die Gelplatte in eine Glaswanne, wo die Fixierung für 60 Min. in 12,5 % Trichloressigsäure erfolgt.

An die Fixierung schließt sich die Färbung (5) mit 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (37) in 12,5 % Trichloressigsäure über einen Zeitraum von 4 Stunden auf einer elektrisch bewegten Schaukel (10) an.

Das Gel wird nach erfolgter Färbung gründlich in destilliertem Wasser gewaschen, und dann in eine eigens entwickelte Entfärbekammer (Abb. 3) gegeben. In dieser läßt

sich über Nacht die Entfärbung ebenfalls in 12,5 % Trichloressigsäure durchführen. Die Säure wird dabei fortwährend durch eine

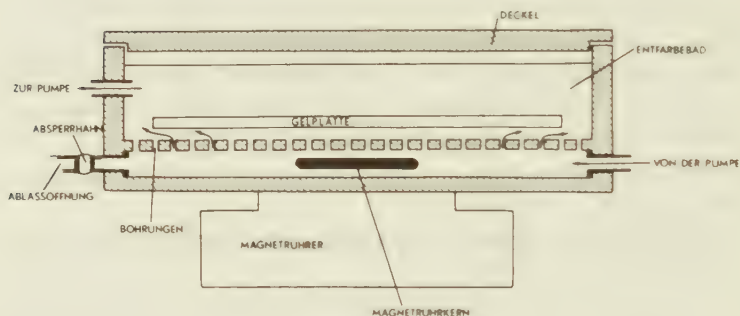


Abb. 3 Entfärbekammer (Schnitt)

Pumpe umgewälzt, und zusätzlich noch mittels eines Magnetührers in Bewegung gehalten.

Das Entfärben wird so auf eine sehr schonende Weise durch erschöpfendes Auswaschen des nicht an Protein gebundenen Farbstoffes erreicht.

Am nächsten Morgen wird das Gel sorgfältig in destilliertem Wasser gespült, und kann dann ausgewertet werden.

Im Dunkeln lassen sich Gele in dest. Wasser auch über längere Zeit aufbewahren, ohne daß merkliche Intensitätsänderungen der Banden gemessen werden konnten.

8) Auswertung

Über einem Leuchtpult, wie man es zur Betrachtung von Röntgenbildern verwendet, werden die Gelplatten im Durchlicht unter Zuhilfenahme eines dunklen Orange-filters photographiert.

Die photometrische Auswertung der einzelnen Gelstreifen erfolgte mit einem Filterphotometer⁸⁾ (zusätzlich Pherogrammauswerter 2602 mit angefertigter Küvette) bei 546 nm (37). Das Bandmuster der rechteckigen Gelstreifen läßt sich im Gegensatz zu Gelzylindern ohne sphärische Aberration registrieren.

Der Nachteil des verwendeten Photometers liegt darin, daß man nur Gelstreifen bis maximal 12 cm Länge auswerten kann, und so die Möglichkeiten der Elektrophoresekammer bezüglich Trenn- bzw. Auflösungsvermögen nicht in vollem Umfang ausnützt.

8) Photometer EPPENDORF, Fa. NETHELER & HINZ

9) Untersuchungsmaterial

Substanzen mit definiertem Molekulargewicht

Myoglobin (Pferd)	17800	5
Chymotrypsinogen A	25000	5
Albumin (Hühnerei)	45000	5
Albumin (Rind)	67000	5
Aldolase (Kaninchen)	ca. 147000	5
Katalase (Rind)	ca. 240000	5
Ferritin (Pferd)	ca. 480000	5
Humanalbumin	69000	9
Transferrin	90000	9

Normalseren:

klin. gesunde Blutspender

Pathologische Seren:

Plasmocytomseren

 5) Fa. SERVA, Heidelberg

9) Fa. BEHRING-WERKE, Marburg/Lahn

D: ERGEBNISSE

I) Untersuchungen der Trenneigenschaften

- 1) Ermittlung der optimalen SDS-Probenabsättigung bei SDS-freiem Gel

Nachdem es das Ziel war, mit einem SDS-freiem Gel zu arbeiten (weniger Aufwand, stabilere Geltaschen), mußte empirisch ermittelt werden, wie hoch die Proben mit SDS abgesättigt werden müssen, um dasselbe Ergebnis zu erhalten, wie es in mehreren Vorversuchen mit SDS-haltigen Gelen (SDS im Gel 0,1% und in der Probe 1%) erzielt worden war. Zu diesem Zwecke wurden Versuche durchgeführt, in denen verschieden hoch mit SDS versetzte Proben aufgetragen wurden.

- | | |
|----------------------------------|----------------------|
| 1) 100 μ l Serum | |
| 2) 100 μ l Serum + 1 mg SDS | Zugabe des SDS durch |
| 3) 100 μ l Serum + 2 mg SDS | Einwiegen und |
| 4) 100 μ l Serum + 5 mg SDS | Inkubation für |
| 5) 100 μ l Serum + 8 mg SDS | 30 Min. bei 30°C |
| 6) 100 μ l Serum + 10 mg SDS | |
| 7) 100 μ l Serum + 20 mg SDS | |

Höhere SDS-Konzentrationen verursachten eine so hohe Viskosität, daß ein Aufbringen der Proben mit der Spritze unmöglich war.

Nach Auswertung der Gelstreifen mit dem Photometer zeigt sich deutlich, daß für SDS-Mengen kleiner 8 mg der Albumingipfel nicht symmetrisch ist, und auch in der Lage nicht mit dem übereinstimmt, der sich als symmetrischer Gipfel für SDS-Mengen größer 8 mg ergibt. Die für SDS-Mengen größer 8 mg erhaltenen Kurven stimmen recht gut mit dem Bild überein, welches sich für dasselbe Serum in den mit SDS-haltigen Gelen durchgeführten Vorversuchen

ergab (Abb. 4).

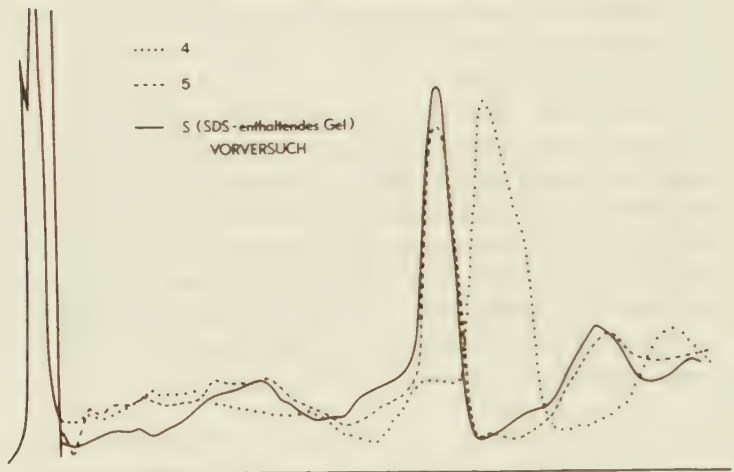


Abb. 4 Pherogramme eines mit verschiedenen hohen
SDS-Mengen behandelten Serums
4,5 (siehe oben)
S Serum im SDS-haltigen Gel (Vorversuch)

- 2) Prüfung der Trenneigenschaften mit Eichsubstanzen
definierter Molekulargewichte
- a) mit der Zelluloseacetatfolienelektrophorese
- aa) Substanzen unbehandelt (Abb. 7)

Vergleicht man nach durchgeführter Trennung die von den einzelnen Substanzen zurückgelegten Strecken miteinander, so lassen sich zwar beträchtliche Unterschiede feststellen, allerdings zeigen die Wanderstrecken keine Beziehung zur Molekülgröße, was auch bei der nur nach Ladung trennenden Acetatfolienelektrophorese nicht anders zu

erwarten ist.

ab) Substanzen SDS-behandelt

Wenn man davon ausgeht, daß SDS-Protein-Komplexe nach außen eine gleich große negative Ladung besitzen, dürfte ein Proteingemisch auf Acetatfolienträgern nicht getrennt werden. Der Versuch, mit einem SDS-abgesättigten Proteingemisch und einzelnen SDS-abgesättigten Substanzen ausgeführt, zeigte keine Trennung des Gemisches; es fand eine Wanderung statt, die für die verschiedenen Einzelsubstanzen identisch war.

b) mit der Polyacrylamidelektrophorese (Abb. 5)

Substanzen mit definiertem Molekulargewicht

a) Myoglobin (Pferd)	17800
b) Chymotrypsinogen A	25000
c) Albumin (Hühnerei)	45000
d) Albumin (Rind)	67000
e) Aldolase (Kaninchen)	ca.147000
f) Katalase (Rind)	ca.240000
g) Ferritin (Pferd)	ca.480000
h) Humanalbumin	69000
i) Transferrin	90000

Nach Durchführung der Polyacrylamidelektrophorese fällt auf, daß einige Substanzen nicht nur eine, sondern mehrere Banden zeigen; wahrscheinlich handelt es sich dabei um Untereinheiten und/oder Oligomere und Polymere. Wählt man die Albuminbande (Rind) als 100, und drückt die von den einzelnen Substanzen zurückgelegte Strecke als R_f -Wert aus (Abb.7), so zeigt sich, daß die Trennung nicht nach der Größe der Moleküle erfolgt. So wandert beispielsweise das relativ kleine Myoglobin weniger weit

als das Ferritin mit einem ungleich höheren Molekulargewicht.

c) mit der Polyacrylamidelektrophorese und Behandlung mit SDS

Das bei der Ermittlung der optimalen SDS-Probenabsättigung unter I) erhaltene Ergebnis ließ die vereinfachte SDS-Methode in ihrer Anwendung als sinnvoll erscheinen: um aber sicherzustellen, daß diese Methode die gleichen Ergebnisse zu erzielen vermag wie jene, welche mit SDS im Gel arbeitet, wurde ein Versuch angeschlossen, in dem Proteine mit definierten Molekulargewichten untersucht wurden (Abb.5).

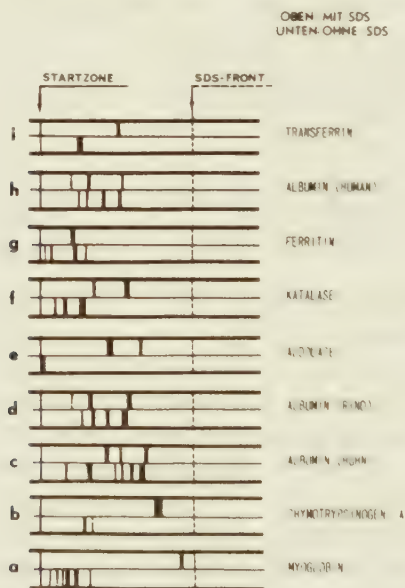


Abb. 5 Als direkter Vergleich zur SDS-Methode (im Bild jeweils oben) wird die normale Polyacrylamidelektrophorese gezeigt a-i (siehe oben)

Es zeigt sich, daß die einzelnen Substanzen während der Elektrophorese verschieden weit gewandert sind, und darüber hinaus fällt auf, daß manche Proteine, wie schon bei der Polyacrylamidelektrophorese beobachtet, nach dem Lauf mit SDS mehrere Banden aufweisen, deren Anzahl hier jedoch geringer ist. Vergleicht man auf der Gelplatte die einzelnen Bahnen miteinander, so kann man eine allen gemeinsame Front erkennen, was vermutlich einem SDS-Überschuß entspricht.

d) SDS-Kontrollversuch (Abb. 6)

Mit den bereits oben aufgeführten Substanzen a,b,c,d und f wurde unter gleichen Bedingungen ein Versuch abgeschlossen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

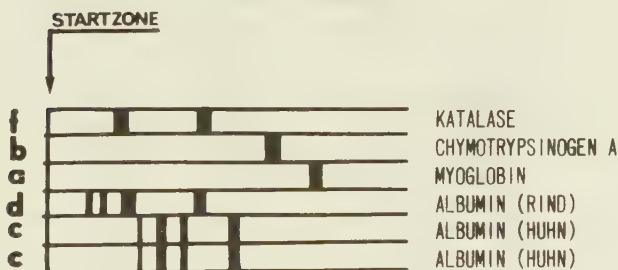


Abb. 6 a,b,c,d und f (siehe oben)
nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Verhaltens
der Testsubstanzen bei

Trennung gemäß
elektr. Ladung MG

A) Polyacrylamidelektrophorese	+	+
B) SDS-Polyacrylamidelektrophorese	-	+
C) Zelluloseacetatfolienelektrophorese	+	-

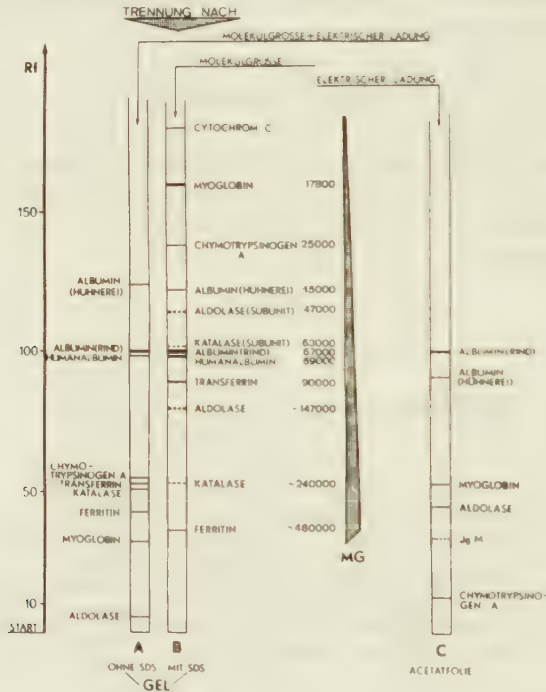


Abb. 7 Schematische Darstellung der Rf-Werte nach

- A) Polyacrylamidelektrophorese
- B) SDS-Polyacrylamidelektrophorese
- C) Zelluloseacetatfolienelektrophorese

wurden in Abb. 7 die relativen Beweglichkeiten (R_f) der einzelnen Proteine (als Bezugspunkt 100 wurde das Rinderalbumin gewählt) bei den drei angewendeten Elektrophoreseverfahren parallel nebeneinander aufgetragen.

Trägt man dazu die Molekulargewichte der Proteine auf, so läßt sich bereits das beim SDS-Verfahren zu erwartende Verhalten, die Auftrennung nach dem Molekulargewicht (MG), zumindest in relativer Form erkennen.

Zwei Substanzen allerdings, und zwar die Aldolase und Katalase, scheinen dieser Gesetzmäßigkeit nicht zu ge-

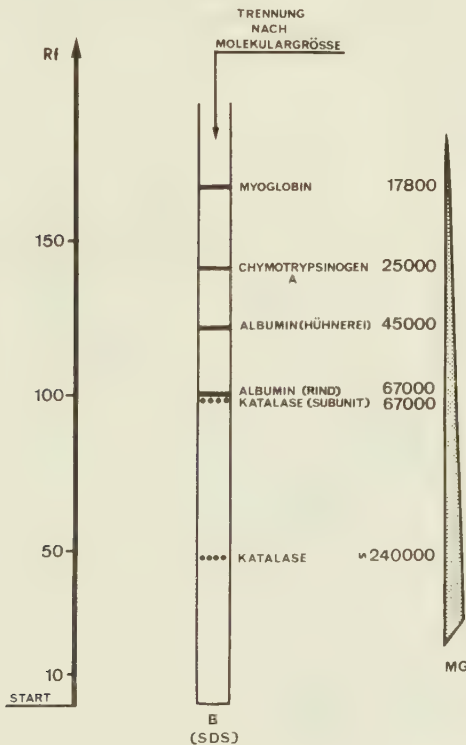


Abb. 8 Darstellung der R_f -Werte von a, b, c, d und f (siehe oben)

horchen.

Der durchgeführte Kontrollversuch (Abb. 8) bestätigt die vorherigen Ergebnisse, wenn man einmal davon absieht, daß die Katalase zuvor knapp vor dem Albumin (Rind) lag, und nun direkt hinter der Albuminbande zu finden ist.

Zeigt die SDS-Polyacrylamidelektrophorese auch bereits eine relative Auftrennung der Proteine nach den Molekulargewichten, gilt es nun zu untersuchen, ob zwischen relativer Beweglichkeit und Molekulargewicht eine gesetzmäßige Abhängigkeit besteht; zu diesem Zweck wird der Rf-Wert gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen (Abb. 9).

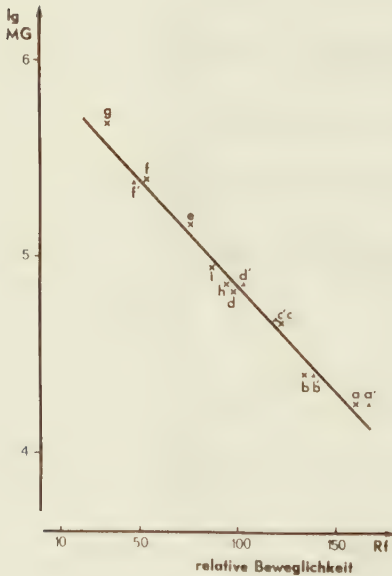


Abb. 9

Relative Beweglichkeit (Rf) gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen

a - i (siehe oben)
a', b', c', d', f'
(Kontrolle)

Es zeigt sich dabei eine Linearität im Bereich von etwa 20000-250000; das Ferritin mit einem Molekulargewicht von etwa 480000 sowie das Myoglobin mit 17800 zeigen die stärksten Abweichungen vom erwarteten Wert und markieren damit die Grenzen der Linearität der Beziehung.

Über den Rf-Wert läßt sich mit Hilfe der erstellten Geraden das Molekulargewicht berechnen. Wählt man auf der Ordinate eine semilogarithmische Einteilung, so ist ein direktes Ablesen des Molekulargewichtes möglich (Abb.10).

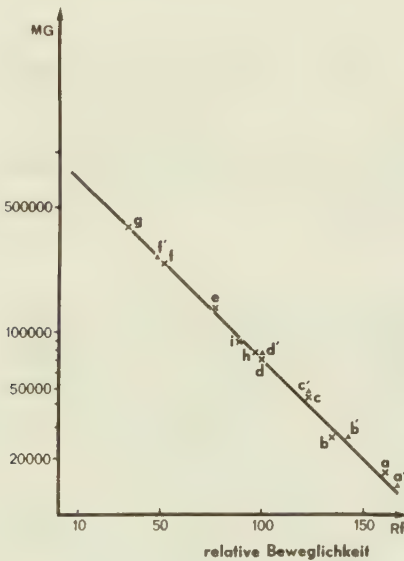


Abb. 10 Rf-Wert gegen das Molekulargewicht (MG)
aufgetragen (semilogarithmische Skala)
a - i (siehe oben)
a', b', c', d', f' (Kontrolle)

Auf diese Weise erscheint die Identifizierung von Pro-

weisen durch Ermittlung des Molekulargewichtes über den Rf-Wert und die Eichgerade möglich.

Ebenso ist es möglich, die Molekulargewichte für die Aldolase und Katalase zu berechnen, die, wie bereits erwähnt, mehrere Banden zeigen.

Für die Aldolase findet sich neben einem Wert von 133000 einer von 47000, was einer Untereinheit zu entsprechen scheint. Ähnliches gilt für die Katalase: 240000, wie erwartet, und zudem ein Molekulargewicht von 67000 bzw. 67000.

Anhand der schon angesprochenen Eichgeraden wurde ausgehend von der relativen Beweglichkeit der einzelnen Substanzen deren Molekulargewicht berechnet, und der gefundene Wert in Form einer prozentualen Abweichung dem Sollwert gegenübergestellt (Abb. 11).

		lg	MG	MG	SOLLWERT	DIFFERENZ	PROZ. ABWEICHUNG		
a	MYOGLOBIN	421	16300	13500	17800	1500	4308	-84	+240
b	CHYMOTRYPSINOGEN A	444	27500	25700	25000	2500	700	+100	+20
c	ALBUMIN (CHÜHNEREI)	463	43000	43000	45000	2000	2008	-44	-44
d	ALBUMIN (RIND)	485	71000	70000	67000	4000	3008	+60	+45
e	ALDOLASE	512	133000		147000	14000		-95	
e'	ALDOLASE	467	47000		40000	7000		+172	
f	KATALASE	538	240000	202000	240000	0	22000	±0	+93
f'	KATALASE	480	63000	67000	60000	3000	7000	+50	+110
g	FERRITIN	567	375000		480000	105000		-220	
h	HUMANES ALBUMIN	487	74000		69000	5000		+72	
i	TRANSFERRIN	496	91000		90000	1000		+11	



KONTROLLVERSUCH

• SOLLWERTE nach WEBER/OSBORN (39)

Abb. 11 Prozentuale Abweichung des ermittelten Molekulargewichtes vom Sollwert

Die Tabelle zeigt, daß neben dem Myoglobin und Ferritin auch die Aldolase- und Katalaseuntereinheiten außerhalb der $\pm 10\%$ Fehlergrenze liegen.

3) Auftrennung eines Gemisches

Da bisher nur mit einzelnen Substanzen gearbeitet wurde, sollte in einem einfachen Versuch die Möglichkeit der Gemischauftrennung getestet werden.

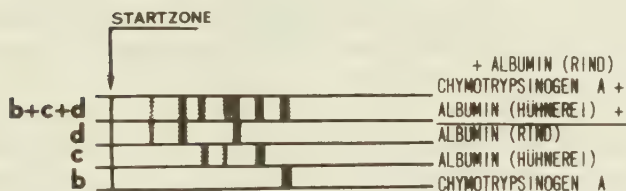


Abb. 12 Auftrennung eines Gemisches,
bestehend aus b, c und d

Die Trennung der einzelnen im Proteingemisch enthaltenen Komponenten kommt recht gut zum Ausdruck (Abb.12).

4) Allgemeines

Empirisch ließ sich ermitteln, daß mit steigenden Serum- bzw. Proteinauftragsmengen eine zunehmende Unschärfe der Banden einhergeht.

Mit ein und derselben Substanz durchgeführte Elektrophoresen (24 Trennungen in einem Lauf) zeigten die sehr gute Reproduzierbarkeit der Polyacrylamidelektrophorese.

Bei genau eingehaltenen Färbe- und Entfärbezeiten ergaben sich auch bei der quantitativen Auswertung gut reproduzierbare Absolutwerte.

Das Weglassen von Merkaptoäthanol beim SDS-Versuch ließ keinen Nachteil erkennen.

Versuche, die eine eventuelle Bandenveränderung bei alten Seren aufdecken sollten, zeigten auch bei einer Woche alten, im Kühlschrank aufbewahrten Seren, keine Abweichungen gegenüber sofort durchgeführten Elektrophoresen.

Die Qualität der Trennung von Serumproteinen kann verbessert werden, indem man die Auftragsmenge möglichst klein hält, oder aber die Laufstrecke verlängert. Was letzteren Punkt angeht, zeigte sich der Pherogrammsatz 2602 des verwendeten Photometers als limitierender Faktor.

Die lineare Beziehung zwischen Laufstrecke und Zeit bei Anwendung konstanter Stromstärke erwies sich auch für das praktische Arbeiten als nützlich.

II) Untersuchungen an Normalseren

1) ohne SDS

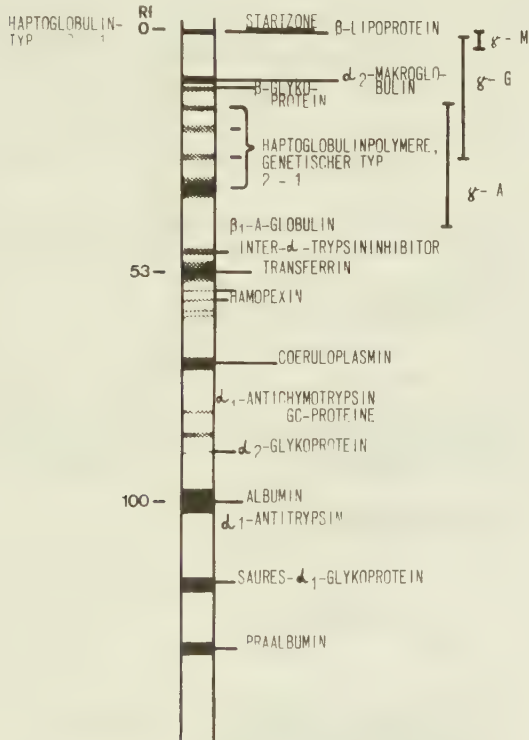


Abb. 13 Klassifizierung der Banden nach
HOFFMEISTER (16, 17)

Die Abb. 13 zeigt die Auftrennung eines Serums vom
Haptoglobintyp 2-1 (16, 17).

2) mit SDS

Der auffälligste Befund der an Normalseren mit der SDS-Polyacrylamidelektrophorese durchgeführten Untersuchungen ist im Vergleich zur Polyacrylamidelektrophorese wohl das geringere Auftreten von schmalen, markanten Banden bzw. Gipfeln, so daß daraus ein weniger differenziertes Bild resultiert (Abb. 14).

Das Pherogramm eines mit der SDS-Methode untersuchten Normalserums kam bereits in Abb. 4 zur Darstellung.

III) Untersuchungen an Plasmocytomseren (Abb. 14)

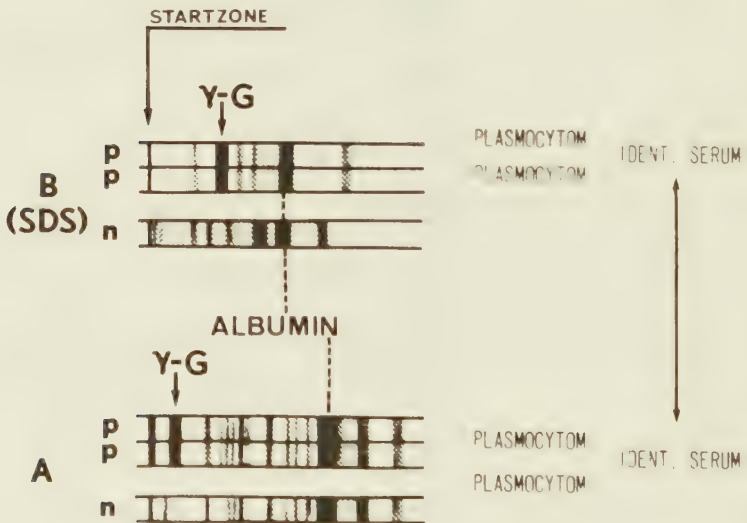


Abb. 14 A ohne B mit SDS
n Normalserum
p Plasmocytom

1) ohne SDS

Es zeigt sich ein hohes α_1 -Antitrypsin (abgestufter Albumingipfel) und eine deutliche Verminderung von Albumin und Transferrin. In der γ -Globulinzone, in der sich normalerweise nur annähernd Einzelkomponenten erkennen lassen, tritt eine starke Bande hervor, die man aufgrund ihrer Lage zu den γ -G-Globulinen zählen müßte.

2) mit SDS

Im SDS-Verfahren kommt eine besonders markante und ins Auge fallende Veränderung zum Ausdruck. Mit Hilfe des Rf-Wertes läßt sich unter Ermittlung des Molekulargewichtes für einen Bereich von etwa 150000-175000 auch die Diagnose eines γ -G Plasmocytoms stellen; ein γ -A Plasmocytom zeigte ein etwas höheres Molekulargewicht. Zur Überprüfung wurde zusätzlich eine immunologische Untersuchung angeschlossen, die dieses Ergebnis bestätigte.

E: DISKUSSION

1) Zur eigenen Modifikation der Methodik

Das von WEBER und OSBORN (39) angegebene Verfahren des Arbeitens mit SDS erschien zu aufwendig, und so galt es zunächst, eine einfachere Form der Durchführbarkeit zu ermitteln.

Nachdem bei Versuchen aufgefallen war, daß SDS-freie Gele weitaus stabilere Probentaschen zeigten, und so ein besseres Auftragen der Proben gewährleistet war, war es das Ziel, SDS nur noch in Probe und Puffer zu verwenden.

Die zur Absättigung der Proben nötige SDS-Menge ließ sich empirisch ermitteln, und für eine Probenabsättigung von mindestens 8 mg SDS/100 µl Serum ergibt sich ein Phorogramm, das gut mit jenem korreliert, welches vom gleichen Serum in einem Vorversuch bei 1% SDS-Probenabsättigung und SDS-enhaltendem Gel (0,1%) bei identischem Puffersystem aufgezeichnet wurde.

Nachdem kein Unterschied beim Arbeiten mit und ohne Merkaptoöthanol festgestellt werden konnte, wurde dieser zur weiteren Vereinfachung weggelassen. Bereits CHISA (4) verzichtete auf Merkaptoöthanol. Auch BLATTNER (4) konnte bei Verwendung von Merkaptoöthanol die Trennergebnisse nicht verbessern.

Diese vereinfachte Probenaufbereitung bedeutet eine erhebliche Erleichterung im Vergleich zu dem aufwendigen Dialysierverfahren, wie es von BLATTNER (24) angegeben wurde.

Liefert das SDS-freie Gel bereits stabile Probentaschen, so wurde darüber hinaus ein Zeitgewinn erzielt, da SDS-behandelte Proben im SDS-freien Gel schneller wandern als in einem, welches SDS enthält (3).

2) Bestimmung des Molekulargewichtes

Substanzen mit definiertem Molekulargewicht wurden mit der Polyacrylamidelektrophorese nach SDS-Behandlung untersucht. Anschließend wurden die ermittelten Rf-Werte der einzelnen Proteine gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes in ein Koordinatensystem eingetragen.

In dem Bereich von etwa 20000-250000 ergab sich dabei eine lineare Abhängigkeit (Abb. 9,10) zwischen relativer Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes (34).

Der für die Linearität gefundene Bereich von 20000-250000 stimmt gut mit dem von DUNKER und RUECKERT (11) für 5% Gele von 20000-350000 angegebenen Bereich überein, wenn man berücksichtigt, daß in den durchgeführten Versuchen keine Proteine mit einem definierten Molekulargewicht zwischen 250000 und 350000 getestet wurden.

Wenn das Myoglobin und das Ferritin der Linearität nicht mehr gehorchen, so ist das durchaus verständlich, da SHAPIRO (34) in seinen Arbeiten gefunden hat, daß die Funktion zwischen relativer Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes über den ganzen Bereich betrachtet hyperbol ist.

Abb. 11 verdeutlicht, daß mit Ausnahme des Myoglobins und des Ferritins (fallen nicht in den linearen Bereich, der die Berechnung des Molekulargewichtes sicher ermöglicht) und den Untereinheiten von Aldolase und Katalase eine Fehlerquote von $\pm 10\%$ nicht überschritten wird; DUNKER und RUECKERT (11) sprechen von maximal 11%, WEBER und OSBORN (39) geben eine prozentuale Abweichung vom Sollwert von höchstens $\pm 10\%$ an.

Die Dissoziation bestimmter Moleküle durch SDS, die unter nativen Bedingungen als Oligomere vorliegen, in Untereinheiten, wurde bereits von BARNETT (2) und BLATTNER (3) beschrieben. Die in den Versuchen neben den erwarteten Molekulargewichten noch gefundenen kleineren Werte für die Aldolase (47000) und Katalase (65000 bzw. 67000) stimmen recht gut mit den von WEBER und OSBORN (39) für die Aldolase (40000)- und Katalaseuntereinheit (60000) angegebenen Werten überein.

Die mit dem von uns modifizierten Verfahren¹⁰⁾ durchgeführten Molekulargewichtsbestimmungen zeigen, daß in einem Bereich von 20000-250000 die elektrophoretische Beweglichkeit des SDS-Protein-Komplexes eine Funktion des Molekulargewichtes ist (11,31,33,34,39).

Die bei den Trennungen beobachtete SDS-Front stimmt mit den Ergebnissen von SHAPIRO (33) überein.

Auch die von SHAPIRO (34) gezeigte Auftrennung von Proteingemischen in die einzelnen Komponenten gelingt mit dem hier beschriebenen Verfahren gut (Abb. 12).

Die beim Albumin zu beobachtende Auftrennung in mehrere Banden wurde von CHIGA (4) beschrieben und die Fraktionen als Dimere, Trimere und Oligomere klassifiziert.

¹⁰⁾ Nach Abschluß des experimentellen Teiles der Arbeit erhielten wir Kenntnis von einer Veröffentlichung, in der STOKLOS und LANE (38) darüber berichten, daß sie mit einer vereinfachten Modifikation des von WEBER und OSBORN (39) beschriebenen Verfahrens, nämlich durch alleinige Behandlung der Proben mit SDS, bezüglich der Linearität zwischen Molekulargewicht und relativer Beweglichkeit, der Intensität und Schärfe der Banden sowie der Reproduzierbarkeit die gleichen Ergebnisse erzielen konnten.

3) Vergleichende Serumuntersuchungen

Die an mehr als hundert Normalseren durchgeführten Auftrennungen mit Hilfe der Polyacrylamidelektrophorese zeigen weitgehende Übereinstimmung (Abb. 13) mit bisherigen Veröffentlichungen (1,12,16,17,21) ; die Zuordnung zu einem der Haptoglobintypen war fast in allen Fällen möglich (1,17,25,26,36).

Die mit den gleichen Normalseren nach Behandlung mit SDS durchgeführten Versuche lieferten ein Pherogramm, das wohl am meisten, vor allem im Vergleich zur Bandenvielfzahl der Polyacrylamidelektrophorese, durch eine geringe Anzahl von schmalen Gipfeln und deutlichen Banden gekennzeichnet ist; demgegenüber berichtet CHIGA (4) allerdings, bei der Auftrennung von Humanseren sechs deutliche Banden erhalten zu haben.

Mit den beiden Methoden der Polyacrylamidelektrophorese (mit und ohne SDS) sollten einige Plasmocytomseren vergleichend untersucht werden. Untersuchungen an Plasmocytomseren wurden von mehreren Autoren (7,9,13,19,40) mit der Disk-Methode durchgeführt, und es wurde von der Möglichkeit berichtet, auf diese Weise ein γ -A von einem γ -G-Plasmocytom unterscheiden zu können.

DIESSNER (9) gibt an, daß die γ -A-Bande etwas weiter anodenwärts liegt als die γ -G-Bande. Außerdem könnte eine zusätzliche Differenzierung zwischen γ -G und γ -A-Paraproteinen mit der Kohlenhydratfärbung erfolgen, da γ -A-Paraproteine sehr stark PAS-positiv sind im Gegensatz zu den γ -G-Plasmocytomen (9).

Die Behandlung der Plasmocytomseren mit SDS, die zu einer markanten Veränderung im Pherogrammbild führt, ist eine weitere Möglichkeit, zwischen γ -A und γ -G Paraproteinen zu differenzieren. Mit Hilfe der relativen Beweglich-

keit (Rf-Wert) läßt sich über eine Eichgerade das Molekulargewicht ermitteln und so eine Unterscheidung in χ -A und χ -G treffen, während bei Verzicht auf SDS eine Differenzierung nur über die relative Lage der Bande zur Anode möglich ist.

Die SDS-Methode erlaubt, Proteine nach dem berechneten Molekulargewicht zu identifizieren. Finden sich für χ -3 Plasmocytome Molekulargewichtswerte von 150000-175000, so liegen die für χ -A etwas höher.

Um absolute Aussagen zu machen, reicht das untersuchte Material noch nicht aus. Ziel dieser Arbeit war es in erster Linie, eine relativ einfach durchzuführende Modifikation des SDS-Verfahrens zu entwickeln, und dann auf die Möglichkeit der Miteinbeziehung des Molekulargewichtes bei parallelem Arbeiten mit und ohne SDS hinzuweisen.

F: ZUSAMMENFASSUNG

Für die Polyacrylamidelektrophorese mit SDS wurde eine vereinfachte Modifikation entwickelt, die außer dem Verzicht der Probenbehandlung mit Merkaptoäthanol auch ein völlig SDS-freies Gel aufweist, das sich durch stabilere Probestaschen auszeichnet. Das angewandte Verfahren stellt eine wesentliche Vereinfachung der bisher üblichen Methode dar.

Mit der eigenen SDS-Modifikation durchgeführte Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen definierten Molekulargewichtes ergaben im Bereich von 20000-250000 eine lineare Funktion zwischen relativer Beweglichkeit und dem Logarithmus des Molekulargewichtes.

Die prozentuale Abweichung der für die einzelnen Proteine ermittelten Molekulargewichte vom Sollwert betrug für den als linear angegebenen Bereich maximal $\pm 10\%$.

Damit konnte gezeigt werden, daß trotz der einfacheren Arbeitstechnik die Genauigkeit gegenüber den bisher geübten wesentlich aufwendigeren Methoden unverändert erhalten blieb.

Etwa hundert Normalseren wurden mit und ohne SDS vergleichend untersucht. Im Gegensatz zur großen Anzahl von gut abgrenzbaren Banden bei der Polyacrylamidelektrophorese zeigt sich nach SDS-Behandlung der Proben ein Bild, das nur relativ wenige Banden aufweist.

Bei der vergleichenden Untersuchung von zehn Plasmocytomseren ließ sich zwar mit beiden Methoden die Diagnose Plasmocytom stellen, doch kann man nach SDS-Behandlung über die Berechnung des Molekulargewichtes eindeutiger zwischen γ -A und γ -G Paraproteinen differenzieren als es bei der Polyacrylamidelektrophorese nur aufgrund der relativen Lage der charakteristischen Bande möglich ist.

- 18) KEUTEL, H.J. A comparison of agar and acrylamide gel microimmunoelectrophoretic techniques for the separation of urinary colloids
Annals N.Y. Acad. Sci.
121 : 484 (1964)
- 19) KOCHWA, S. Abnormal Proteins and Protein
SMITH, E. Fractions in Myeloma
DAVIES, B.J. Annals N.Y. Acad. Sci.
WASSERMAN, L.R. 121 : 445 (1964)
- 20) KOHLRAUSCH, F. Über Konzentrationsverschiebungen durch Elektrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen
Ann. Physik und Chemie
62 : 209 (1897)
- 21) KRIEG, M. Die immunologische Identifizierung und Lokalisierung der Proteinfractionen nach disk-elektrophoretischer Trennung auf Polyacrylamidgel
WEICKER, H. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
8 : 293 (1970)
- 22) MARGOLIS, J. Polyacrylamide Gel-electrophoresis across a Molecular Sieve Gradient
KENRICK, K.G. Nature 214 : 1334 (1967)
- 23) MAURER, H.R. Disk-Elektrophorese
Verlag Walter de Gruyter & Co.
Berlin 1968

- 24) ORNSTEIN, L. Disc Electrophoresis: Background
and Theory
Annals N.Y. Acad. Sci.
121 : 321 (1964)
- 25) PASTEWKA, J.V. Electrophoretic Patterns of Nor-
NESS, A.T. mal Human Serums by Disc Electro-
PEACOCK, A.C. phoresis in Polyacrylamide Gel
Clin. Chim. Acta 14 : 219 (1966)
- 26) PEACOCK, A.C. Serum Protein Electrophoresis in
BUNTING, S.L. Acrylamide Gel: Patterns from
QUEEN, K.G. Normal Human Subjects
Science 147 : 1451 (1965)
- 27) RAYMOND, S. Acrylamide Gel Electrophoresis
Annals N.Y. Acad. Sci.
121 : 350 (1964)
- 28) RAYMOND, S. Acrylamide Gel as an Electropho-
NAKAMICHI, M. resis Medium
Nature 195 : 697 (1962)
- 29) RAYMOND, S. Electrophoresis in Synthetic Gels
NAKAMICHI, M. II. Effect of Gel Concentration
Anal. Biochem. 7 : 225 (1964)
- 30) RAYMOND, S. Acrylamide Gel as a Supporting
WEINTRAUB, L. Medium for Zone Electrophoresis
Science 130 : 711 (1959)

- 31) REYNOLDS, J.A. The Gross Conformation of Protein-
TANFORD, C.J. -Sodium Dodecyl Sulfate Complexes
J. Biol. Chem.
245 : 5161 (1970)

- 32) SCHÜTT, K.H. Kontinuierliche Polyacrylamid-
HOFFMEISTER, H. -Elektrophorese II
Möglichkeiten zur Diagnose von
malignen und entzündlichen Erkrank-
ungen der Lunge
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
9 : 201 (1971)

- 33) SHAPIRO, A.L. Molecular Weight Estimation of
MAIZEL, J.V. Polypeptides by SDS-Polyacrylamide
Gel Electrophoresis: Further Data
Concerning Resolving Power and
General Considerations
Anal. Biochem. 29 : 505 (1969)

- 34) SHAPIRO, A.L. Molecular Weight Estimation of
VINUELA, E. Polypeptide Chains by Electropho-
MAIZEL, J.V. resis in SDS-Polyacrylamide Gels
Biochem. Biophys. Research Comm.
28 (No 5): 815 (1967)

- 35) SLATER, G.G. Electrophoresis on a density gra-
dient of polyacrylamide gel -
apparatus and examples
Federation Proc. 24 : 225 (1965)

- 36) SMITHIES, O. Zone Electrophoresis in Starch
Gels: Group Variations in the
Serum Proteins of Normal Human
Adults
Biochem. J. 61 : 629 (1955)

- 37) ST. GROTH, F.S. de Two new Staining Procedures for
WEBSTER, R.G. Quantitative Estimation of Proteins
DATYNER, H. on Electrophoretic Strips
Biochim. Biophys. Acta
71 : 377 (1963)
- 38) STOKLOSA, J.T. Molecular Weight Determinations
LATZ, H.W. by Polyacrylamide Gel Electropho-
resis with Sodium Dodecyl Sulfate
in Just the Sample Solution
Biochem. Biophys. Research Comm.
58 (No 1): 74 (1974)
- 39) WEBER, K. The Reliability of Molecular
OSBORN, M. Weight Determinations by Dodecyl
Sulfate-Polyacrylamide Gel Electro-
phoresis
J. Biolog. Chem.
244 (No 16): 4406 (1969)
- 40) ZINGALE, S.B. Disc Electrophoresis Study of
MATTIOLI, C.A. Serum Proteins from Patients with
BOHNER, H.D. Multiple Myeloma and Macroglo-
BUENO, M.P. bulinemia
Blood 22 : 152 (1963)

Herrn Prof. Dr. F. Sebening danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. N. Mandler für die Einführung in die Methodik experimenteller Arbeit, seine wertvollen Anregungen und seine konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Heidrich danke ich für Hinweise zur Durchführung der Polyacrylamidelektrophorese.

Für die Überlassung von Plasmocytomseren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Lamerz und Herrn Dr. Graf von La Rosée.

LEBENS LAUF

Am 14. Juli 1950 wurde ich in Zemun/Jugoslawien als Sohn des Kellners Peter Muschong und seiner Ehefrau Elisabetha, geb. Kemle, geboren.

1953 wurde uns die Ausreise nach Westdeutschland gestattet. In Gelsenkirchen besuchte ich ab 1957 die dortige Volksschule und anschließend das Grillo-Gymnasium.

Nach dem Umzug nach Eching/bei Freising wechselte ich 1963 an die Rupprecht-Oberrealschule (jetzt Rupprecht-Gymnasium) in München, wo ich 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Im gleichen Jahr begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Medizinstudium.

Am 14.10.1971 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, und am 4.4.1973 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.

